

## KÜLÖNBÖZŐ EREDETŰ FOSZFORILÁZOK TISZTÍTÁSA KEMÉNYÍTŐ ADSZORPCIÓS ELJÁRÁSSAL

DR. BESSENYEI JÁNOS és DR. VEREB GYÖRGY

(Közlésre érkezett: 1973. január 19.)

### *Különböző eredetű foszforilázok előállítási módszerei*

A biokémiai irodalomban közismert és a tankönyvekben szereplő gli-kogén foszforiláz alatt általában a nyúl vázizomból preparált foszforilázt értjük. Ez elsősorban azzal magyarázható, hogy a nyúl izomfoszforiláz pre-parálása és tisztítása valósítható meg a legkönnyebben klasszikus bioké-miai módszerekkel. Ezt a módszert először Cori és Green dolgozta ki<sup>2</sup>, majd Fischer és Krebs módosította.<sup>5</sup>

Az izomfoszforiláztól nagymértékben különbözik tulajdonságaiban és előállíthatóságában a májfoszforiláz, amelyet a májban található számos más fehérje mellől sokkal nehezebb tiszta formában kinyerni. A májfosz-foriláz tisztítására Sutherland dolgozott ki módszert.<sup>12</sup>

Mindkét preparálási eljárás lényege az, hogy a megfelelő előkészítés-sel nyert szövetkivonatból a pH fokozatos csökkentésével idegen fehérjé-ket távolítanak el izoelektromos csapadékok leválasztásával, majd ammó-nium-szulfátos frakcionálással nagy specifikus aktivitású foszforiláz pre-parátumhoz jutnak. Izomfoszforiláz preparálása alkalmával Mg-ionok és AMP jelenlétében a foszforiláz kikristályosítható. Ilyen módon, illetve a további átkristályosításokkal nagy tisztaságú homogén preparátum nyer-hető.

Más szövetekből is megpróbálták foszforilázt preparálni és kristályo-sítani, azonban a fenti módszerekkel ezek nem bizonyultak kristályosítha-tóknak. Ez részben ezeknek a foszforilázoknak sajátos tulajdonságaira, illetve a kristályosodást zavaró egyéb fehérje-, vagy nukleinsav-szennye-ződésre vezethető vissza. Éppen ezért az ammónium-szulfátos frakcioná-láson kívül másféle tisztítási eljárásokat is igénybe vettek. Így pl. a máj-foszforiláz tisztításakor kalciumfoszfát-gélre való adszorbeálást és eluálást alkalmaztak, majd ezt követően alkoholos frakcionálást. A nyert, nagy-mértékben tisztított enzim azonban így sem kristályosodott és tisztasági foka sem érte el az izomfoszforilázét.

Újabban foszforilázok tisztítására SEPHADEX gél-szűrést és DEAE cellulóze kromatográfiát<sup>17, 18</sup> alkalmaznak. Azonban a kromatográfiás mód-

szerek hosszadalmasak, elég nehézkesek, nagy anyagveszteséggel járnak, és csak kis mennyiségű enzim preparálására alkalmasak.

Specifikusabbak és kíméletesebbek azok a módszerek, amelyek során a foszforiláznak glikogénnel alkotott komplexét ultracentrifugálással izolálják. Ebből az enzim-szubsztrát komplexből a glikogént amilázzal emésztve eltávolítják, és így nagy tisztaságú preparátumot nyernek.<sup>1, 9, 11</sup>

Ezek a glikogén-komplex izolálásán alapuló módszerek talán egyszerűbbek és specifikusabbak, mint az oszlopkromatográfiás módszerek. Hátrányuk azonban a kis kitermelés és az, hogy a glikogén-foszforiláz komplex izolálása ultracentrifugával nem minden szövetből lehetséges. Elsősorban glikogénben gazdag szövetek jöhetnek számításba, mint pl. a májszövet stb.

Új módszert eredményezett a foszforiláz preparálásában *De La Haba* megfigyelése,<sup>3</sup> aki keményítő oszlopon adszorbeáltatta a foszforilázt, majd híg glikogén oldattal eluálta. Így viszonylag egyszerű, és jó hatásfokkal rendelkező foszforiláz izolálási módszer alapját vetette meg, amelynek legértékesebb tulajdonsága az volt, hogy sokféle szövetből való preparálásra bizonyult alkalmasnak. *De La Haba* módszerével először nyúl izom-foszforilázt izolált. Később alkalmasnak találta számos másfajta foszforiláz, pl. béka vázizom-, nyúl szívizom-, csirke májfoszforiláz és HeLa daganatsejtekben levő foszforiláz preparálására is. Foszforilázt izoláltak még keményítő adszorpciós módszerrel sertésagyból,<sup>4</sup> halizomból<sup>16</sup> és sertésszívól.<sup>6, 15</sup>

Vizsgálataink egyik célja az volt, hogy ezzel a módszerrel különböző eredetű és allosztérikus tulajdonságú foszforilázokat nyerjünk. Mivel a *De La Haba*-féle keményítő adszorpciós eljárást különböző szöveteknél kisebb-nagyobb módosításnak vetették alá, szükségesnek látszott annak tanulmányozása, hogy az egyes módosítások milyen hatást fejtenek ki a tisztítás során kapott végtermékek minőségére, illetve a preparálható foszforilázok mennyiségére. Ezek érdekében tanulmányozni kívántuk:

1. Különböző koncentrációjú glikogén oldatok eluáló effektusát;
2. A különböző eredetű foszforilázok keményítőn történő kötődésének mértékét;
3. A pH hatását a foszforilázok keményítőn történő adszorpciójára;
4. Allosztérikus effektorok hatását a foszforiláz keményítőn való adszorpciójára, illetve glikogénnel történő eluciójára.

## MÓDSZEREK

### *Kísérleteinkben alkalmazott keményítő adszorpciós technika*

A keményítőt desztillált vizes kezelés után 0,1 M NaF—0,001 M EDTA\*—0,015 M MeEtOH\*\* pufferben (pH 6,8) szuszpendáltuk, majd ülepítettük. Dekantálás után a szuszpendálást és az ülepítést háromszor megismételtük, végül azonos térfogatú NaF—EDTA—MeEtOH pufferben szuszpendáltuk és +5° C-ra lehűtöttük.

\*EDTA = Etiléndiamin-tetraecétsav-dinátrium

\*\*MeEtOH = 2-merkáptoetanol

Ebből a keményítő szuszpenzióból 2 cm magas réteget ülepítettünk 1 cm átmérőjű üvegcsőbe, amelynek alját G—3-as üvegszűrő képezte. A leülepedett keményítő oszlopról a tiszta felülúszót leszívtuk, majd a keményítő oszlop tetejére 1 cm átmérőjű szűrőpapírt helyeztünk és 20 ml, a keményítő szuszpendálására használt pufferrel mostuk. Ezután vittük fel a tisztított, vagy a nyers kivonatban levő foszforilázt. Az adszorbeálható anyag átnyomására kézzel kezelhető ballont használtunk.

A foszforilázt tartalmazó oszlopot ezután a fenti NaF—EDTA—MeEtOH pufferrel (pH 6,8) mostuk hidegen ( $+5^{\circ}\text{C}$ ), miközben a nyomást úgy változtattuk, hogy az átfolyás sebessége 5 ml/10 perc legyen. A mosópuffert egy frakcióban (15 ml) fogtuk fel, és az aktivitásméréssel ellenőriztük, hogy tartalmaz-e az oldat foszforilázt.

Mosás után, a megkötött foszforilázt híg glikogénoldattal eluáltuk a keményítő oszlopról. Az eluciót hidegen ( $+5^{\circ}\text{C}$ ) végeztük. Az átfolyás sebességét 5 ml/10 percre állítottuk be. Az eluátumot frakciókba gyűjtöttük, a frakciókban a foszforiláz aktivitását és számos esetben a fehérje mennyiségét mértük.

### *A foszforiláz aktivitásának mérése*

A foszforiláz aktivitásának mérése a glikogénszintézis irányában, a felszabaduló anorganikus P, vagy a lebontás irányában, a képződő glukóz-1-P meghatározásával történik.

Miután az anorganikus P közvetlenül, a glukóz-1-P pedig csak segédenzimek alkalmazásával mérhető, a foszforiláz aktivitásának mérését a glukóz-1-P-ből képződő anorganikus P meghatározásával végeztük.

A foszforiláz-a aktivitását olyan inkubációs közegben mértük, amely 0,016 M glukóz-1-P-ot, 1% glikogént és megfelelően hígított foszforiláz-a enzimet tartalmazott 0,1 M NaF—0,01 M EDTA—0,015 M MeEtOH pufferben (pH 6,8).

A megfelelően hígított foszforiláz 0,2 ml-ét 0,1 ml 1%-os glikogénoldattal összemérve, 5 percig előinkubáltuk  $30^{\circ}\text{C}$ -on. Az előinkubálás célja a foszforiláz-a tetramer alakjának dimerré változtatása volt, mivel enzimatis aktivitással csak a dimer alakú foszforiláz-a rendelkezik. Ezt követően a reakciót a fenti koncentrációjú glukóz-1-P oldat 0,1 ml-ének hozzáadásával indítottuk. Az inkubálás  $30^{\circ}\text{C}$ -on, 10 percig történt. A reakciót ezután 1,6 ml 5%-os TCA (triklórecetsav) hozzáadásával állítottuk le, majd 2,5 ml desztillált víz hozzáadása után Taussky—Shorr módszerével<sup>13</sup> mértük a glukóz-1-P-ből felszabadult anorganikus P mennyiségét. A keményítőn adszorbeált, kimosott, majd eluált foszforilázban a fehérjekoncentráció már olyan kicsi volt, hogy TCA hatására kicsapódás nem történt, és így szűrést sem kellett alkalmazni.

A foszforiláz mennyiségét egységekben fejeztük ki. Egységnyi a foszforiláznak az a mennyisége, amely 1 perc alatt 1  $\mu\text{mól}$  anorganikus P-ot szabadít fel  $30^{\circ}\text{C}$ -on, a fenti viszonyok között.

A foszforiláz-b aktivitásának meghatározása 1 mM AMP-t tartalmazó glukóz-1-P oldattal történt.

## *A nyert foszforilázok glukóz-6-P-vel és ATP-vel való gátlásának mérése*

A különböző eredetű foszforilázok aktivitásának glukóz-6-P-vel és ATP-vel való gátolhatóságát úgy határoztuk meg, hogy párhuzamos aktivitásméréseket végeztünk, mérve a vizsgálandó foszforiláz-b aktivitását az említett effektorok jelenlétében, illetve távollétében. A két mérés eredményeként kapott aktivitások különbségét az effektormentes aktivitás %<sub>0</sub>-ában fejeztük ki.

A hígított foszforiláz-b-t a pufferben oldott glukóz-6-P-vel, valamint az 1%<sub>0</sub>-os glikogén oldattal 30° C-on 5 percig előinkubáltuk. Ezután a reakciót a glukóz-1-P és az AMP hozzáadásával indítottuk, majd 30° C-on 10 percig inkubáltuk. Ezt követően a reakciót 1,6 ml TCA hozzáadásával leállítottuk, térfogatát 2,5 ml desztillált vízzel kiegészítve a glukóz-1-P-ből felszabadult anorganikus P-t *Taussky—Shorr*<sup>13</sup> módszerével határoztuk meg.

A párhuzamosan végzett kontrollmérésnél inhibitort nem alkalmaztunk.

Az ATP-gátlás mérése ugyanígy történt, természetesen itt a pufferben ATP-t oldottunk a glukóz-6-P helyett.

## *EREDMÉNYEK*

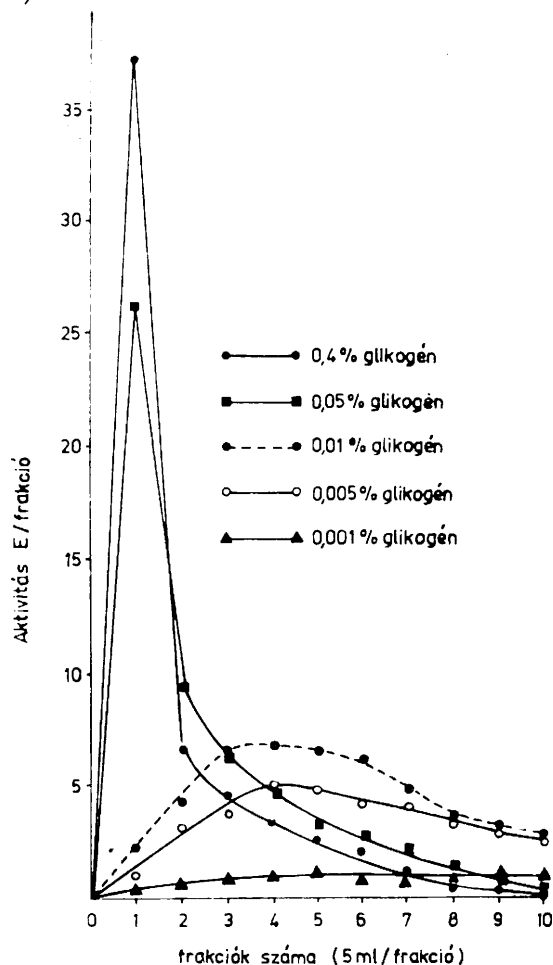
### *A glikogén-koncentráció szerepe a foszforiláz eluálásában*

*De La Habana* és munkatársai<sup>3</sup> a keményítőoszlopon megkötött foszforiláz eluciójára 0,4%<sub>0</sub>-os glikogénoldatot használtak. Nem található azonban irodalmi utalás arra vonatkozólag, hogy a glikogénoldat kisebb koncentrációban rendelkezik-e hatásos eluáló effektussal, illetve, hogy milyen koncentráció felel meg a glikogén eluciós küszöbértékének.

A glikogén eluciós küszöbének meghatározása több szempontból indokolt. Ahhoz, hogy a foszforilázt a nyers preparátumból tisztán (esetleg kristályos állapotban) nyerhessük ki, az eluált foszforiláz mellől a glikogént el kell távolítani. Ez a foszforiláz által katalizált eznimatikus lebontással lehetséges, amely eléggé hosszú folyamat. Minél kisebb koncentrációjú glikogént használunk az elucióhoz, annál kevesebb glikogént kell lebontani, és így rövidebb idő alatt valósítható meg az enzim tisztítása.

Célkitűzéseink között szerepelt annak tanulmányozása is, hogy különböző allosztérikus effektorok befolyásolják-e a glikogén eluáló effektusát, s ha igen, hogyan és milyen mértékben. Feltehető volt, hogy mivel az AMP és a glukóz-1-P fokozza a foszforiláz glikogén iránti affinitását, kisebb koncentrációjú oldata is megfelelő az eluáláshoz. Ebből a szempontból is indokolt a glikogén eluciós küszöbének meghatározása, mivel kisebb koncentrációjú glikogén alkalmazása esetén az allosztérikus effektorok említett hatása is kimutathatóbb módon érvényesülhet.

Vizsgálataink első részében tehát 0,05%-os, 0,01%-os, 0,005%-os, illetve 0,001%-os koncentrációjú glikogénoldat eluáló képességét tanulmányoztuk. (1. ábra.)



1. ábra  
Keményítőoszlopon megkötött, tisztított nyúl vázizomfoszforiláz-b eluciója glikogénnel

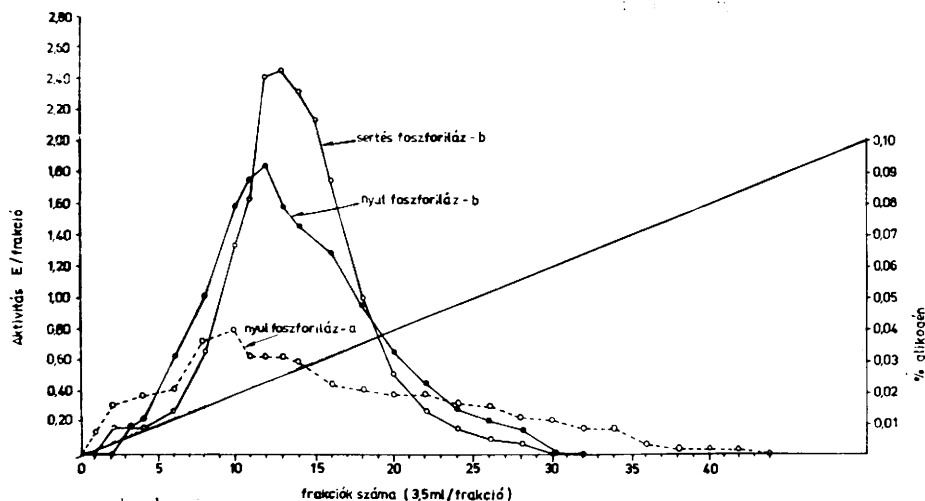
A foszforiláz adszorbeálására 1 cm átmérőjű, 2 cm magas keményítő-oszlopot használtunk. A keményítőt (amylum solubile, MERCK p.a.) 0,1 M NaF—0,001 M EDTA—0,015 M MeEtOH (pH 6,8) pufferben szuszpendálva töltöttük az oszlopba. Az oszlopot az enzim felvitele előtt 20 ml 0,1 M NaF—0,001 M EDTA—0,015 M MeEtOH (pH 6,8) pufferrel mostuk. Ezt követően 59 E aktivitású tisztított nyúl vázizomfoszforiláz-b-t rétegeztünk az oszlopra, 1 ml térfogatban. A keményítőoszlopot az enzim felvitele után

16 ml 0,1 M NaF—0,001 M EDTA—0,015 M MeEtOH (pH 6,8) pufferrel mostuk. A mosó folyadékot egyetlen frakcióban gyűjtöttük össze, és aktivitásméréssel ellenőriztük foszforiláz-tartalmát. Mosás után az adszorbeált enzimet különböző koncentrációjú glikogénoldattal eluáltuk. Az eluálás 5 ml 10 perc átfolyási sebesség mellett történt, a fenti átfolyást biztosító légnyomást alkalmazva. Minden műveletet hidegen (+5° C) végeztünk. A frakciókba gyűjtött eluátum (egy-egy frakció 5 ml) foszforiláz-tartalmát aktivitásméréssel határoztuk meg.

Az 1. ábrából látható, hogy a szokásosan használt 0,4%-os glikogén-oldaton kívül 0,05%-os glikogénoldat is hatásosan eluálja a foszforilázt. Még a 0,01%-os és ennél kisebb koncentrációjú glikogénoldattal is elég jól (79%-ban) visszanyerhető, ha nagy térfogatban is, a felvitt foszforiláz.

A glikogén-koncentráció elució küszöbének meghatározása céljából további vizsgálatokat végeztünk. A glikogén koncentrációját fokozatosan emelve, meghatároztuk azt a minimális glikogén-koncentrációt, amelynél a foszforiláz eluálódni kezd („elució küszöb”).

Mivel feltehető volt, hogy a különböző eredetű foszforilázok különböző erősséggel adszorbeálódnak a keményítőn, és hogy különböző az affinitásuk a glikogénhez is, nyúlizom foszforiláz-a mellett nyúlizom foszforiláz-b és sertésizom foszforiláz-b eluálhatóságát is összehasonlítottuk. Az eredményeket a 2. ábrán tüntettük fel.



2. ábra  
Keményítőoszlopon megkötött, tisztított nyúl izomfoszforiláz-a,  
nyúl izomfoszforiláz-b és sertés izomfoszforiláz-b eluciója

A kísérlet körülményei: 1 cm átmérőjű, 2 cm magas keményítőoszlop, az 1. ábrában leírt módon előkészítve és mosva.

Az oszlopokra vitt enzimek mennyisége és minősége:

●—● 22, E tisztított nyúl izomfoszforiláz-b (5,5 E/ml koncentrációjú oldatban).

o — — — o 22 E tisztított nyúl izomfoszforiláz-a (7,74 E/ml koncentrációjú oldatban).

o—o 22 E tisztított sertés izomfoszforiláz-b (3,87 E/ml koncentrációjú oldatban).

Átfolyási sebesség: 30 ml óra.

A keményítőoszlopot az enzim felvitele után 16 ml 0,1 M NaF—0,001 M EDTA—0,015 M MeEtOH, pH 6,8-as pufferrel mostuk. A mosófolyadékot egy frakcióban gyűjtöttük össze. Aktivitásméréssel ellenőriztük, hogy a mosópufferben nem jelent-e meg aktivitás.

Eluálás gradiens elucióval az I. és II. oldat összekeverése közben.

I. oldat: 100 ml 0,1 M NaF—0,001 M EDTA—0,015 M MeEtOH (pH 6,8).

II. oldat: 100 ml 0,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-os glikogénoldat.

Átfolyás 40 ml/óra, perperex pumpával nyomatva.

A frakciók térfogata: 3,5 ml.

Minden művelet + 5° C-on történt.

A foszforiláz aktivitását 0,1 ml eluátumban határoztuk meg.

Az ábrából kitűnik, hogy 0,01<sup>0</sup>/<sub>0</sub> glikogén-koncentrációnál kezd eluálódni mindhárom foszforiláz. Úgy látszott, hogy a glikogén ilyen töménységben még alkalmas lehet a foszforiláznak keményítőről történő eluálására. Ezért a 0,01<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-os koncentrációt tekintettük a glikogén eluciók küszöbének, s az allosztérikus effektorok hatásának vizsgálatánál mindig ebben a koncentrációban alkalmaztuk a glikogént.

Az ábrából az is leolvasható, hogy a glikogén *eluációs küszöbe különböző eredetű foszforilázok esetén nem különbözik lényegesen*. Az eluáló effektus azonban különbségeket mutat.

A kétféle foszforiláz-b (nyúlizom és sertésizom) eluciója csak kis mértékben eltérő. A sertés foszforiláz-b-ből az optimális koncentrációjú glikogénnel több eluálódik, mint a nyúl izomfoszforiláz-a-ból.

Jelentős eltérés a foszforiláz-b és a között mutatkozik: a foszforiláz-a jóval kisebb mértékben eluálódik, mint a b. Ez arra mutat, hogy a foszforiláz-a erősebben adszorbeálódik keményítőn, mint a b. Erre mutat az elució diagram elnyúlt volta is.

### KÜLÖNBÖZŐ EREDETŰ FOSZFORILÁZOK KEMÉNYÍTŐN VALÓ KÖTÖDÉSÉNEK MENNYISÉGI VISZONYAI

Miután a foszforilázok keményítő adszorpciós technikával történő tisztíthatósága attól is függ, hogy a tisztítandó enzim milyen mértékben kötődik a keményítőn, vizsgálatokat végeztünk arra vonatkozóan, hogy azonos körülmények között a különböző eredetű foszforilázok milyen mennyiségben adszorbeálódnak keményítőoszlopon.

Összehasonlító vizsgálatainkat az alábbi körülmények között végeztük:

*Keményítőoszlop*: a bevezetőben leírt módon preparálva (1 cm átmérő és 2 cm magasság).

Az *oszlopokra* a táblázatban feltüntetett nyers kivonatokat vittük fel. Erre a célra a kísérleti állat leölése után frissen kimetszett izom homogenizátumának felulúsóját használtuk.

Az oszlopokra vitt preparátumokat úgy hígítottuk, hogy kb. 5—10 E/ml foszforiláz aktivitást tartalmazzanak. Oszlopra vitelük és mosásuk kézi ballonnal történt, 30 ml/óra átfolyási sebességgel.

A keményítőoszlopon átfolyt folyadékból 2 ml-es frakciókat gyűjtötünk, s az ezekből történt aktivitásmérések alapján állapítottuk meg az enzim megjelenését az eluátumban, illetve azt, hogy az enzim áttöréséig a vizsgált foszforilázokból hány egységet kötött meg az alkalmazott keményítőoszlop. Áttörésnek tekintettük a 0,5 E/ml-nél nagyobb aktivitás megjelenését az oszlopon átfolyt oldatban.

A vizsgálat minden művelete  $+5^{\circ}\text{C}$ -on és pH 6,8-on történt. Aktivitásmérést a frakciókba gyűjtött minták 0,2—0,2 ml-ből végeztünk.

Méréseink eredményeit az alábbi táblázat szemlélteti:

1. táblázat

*Különböző eredetű foszforilázok adszorbeált mennyisége, azonos méretű keményítőoszlopokon*

Az oszlopokra vitt foszforiláz eredete	Az enzim tisztasága	Az oszlopon áttörésig megkötött enzim mennyisége
Sertés vázizom-foszforiláz-b	20 E/mg protein	32 E
Sertés vázizom-foszforiláz-b	0,2 E/mg protein	48 E
Nyúl vázizom-foszforiláz-b	40 E/mg protein	205 E
Nyúl vázizom-foszforiláz-b	nyers kivonat	230 E
Patkány vázizom-foszforiláz-b	nyers kivonat	72 E
Csirke mellizom-foszforiláz-b	nyers kivonat	25 E
Tengerimalac izom-foszforiláz-b	nyers kivonat	40 E
Sertés simaizom (hólyag)-foszforiláz-b	nyers kivonat	42 E
Patkány májfoszforiláz (aktív)	nyers kivonat	32 E
Sertés szívizom-foszforiláz-b	nyers kivonat	10 E
Nyúl szívizom-foszforiláz-b	nyers kivonat	30 E

A táblázat alapján a következők állapíthatók meg:

Az enzim eredete nagymértékben befolyásolja a kötődés mértékét. Csekély különbség mutatkozik a tisztított és a nyers kivonatban levő



foszforilázok kötődésében. A tisztított enzimekből valamivel kevesebb adszorbeálódik, mint a nyers kivonatban levőkből. A vizsgált fajták közül legjobban a nyúl izomfoszforiláz-b, legkevésbé pedig a sertés szívizom-foszforiláz-b kötődik. Az oszlopra vitt mennyiségekkel még nem merül ki teljesen az oszlop kötőkapacitása, a továbbiakban felvitt foszforiláz még jelentős mértékben kötődik, bár egy része már átfolyik az oszlopon.

### *A pH hatása a kötődésre*

Az előző vizsgálatokban láttuk, hogy a különböző eredetű foszforilázok különböző mértékben kötődnek a keményítőn pH 6,8-on. Miután az enzimek sajátságait igen nagymértékben befolyásolja a közeg pH-ja, célszerűnek látszott annak tanulmányozása is, hogy befolyásolja-e a pH a foszforiláz keményítőoszlopon való kötődését. Ennek érdekében megvizsgáltuk, hogy a különböző állatok azonos szöveteiből preparált foszforilázok kötődése hogyan változik, különböző pH-értékek mellett.

Méréseinket a pH kivételével az előző fejezetben leírtakkal azonos körülmények között végeztük.

Az enzimeket ezekben a kísérletekben is az átfolyó oldatban való megjelenésükig, azaz áttörésig vittük a keményítőoszlopokra.

Az eredményeket a 2. táblázat tünteti fel.

2. táblázat

*pH hatása a különböző eredetű foszforilázok keményítőn való adszorpciójára*

A foszforiláz eredete	A keményítőoszlopon áttörésig megkötött enzim mennyisége			
	pH 6,1	pH 6,8	pH 7,4	pH 8,2
Nyúl izomfoszforiláz-b (nyers)	192 E	230 E	171 E	117 E
Sertés izomfoszforiláz-b (nyers)	48 E	48 E	60 E	36 E
Patkány izomfoszforiláz-b (nyers)	12 E	72 E	130 E	96 E

A táblázatban feltüntetett eredmények szerint a pH is nagy hatással van a kötődés mértékére.

Látható az is, hogy a megvizsgált enzimek közül a nyúl izomfoszforiláz-b optimális adszorpció pH-ja 6,8, míg a sertés és a patkány izom-foszforiláz-b pH 7,4-en kötődik a legjobban.

### *Allosztérikus effektorok befolyása az adszorbeált foszforiláz eluciójára*

A különböző allosztérikus effektorok a foszforiláz aktivitását jelentősen befolyásolják azáltal, hogy az enzim szerkezetében konformáció-vál-

tozást idéznek elő. A pozitív effektorok növelik, míg a negatív effektorok csökkentik a foszforiláz aktivitását. Az aktivitásváltozás egyik oka, hogy az allosztérikus effektorok megváltoztatják a foszforiláz szubsztrátokhoz való affinitását.

A foszforiláz glikogénhez való affinitását több szerző vizsgálta,<sup>7, 8, 10</sup> és megállapította, hogy az allosztérikus effektorok a glikogénhez való affinitást is befolyásolják.

Nem foglalkoztak azonban még azzal, hogy ezek az effektorok befolyásolják-e a foszforiláznak a keményítőhöz való kötődését, illetve a keményítőn megkötött foszforiláz glikogénnel történő elucióját.

Megvizsgáltuk tehát az enzim aktivátorának, az AMP-nek, valamint az enzim inhibitorainak, a glukóz-6-P-nek és az ATP-nek a hatását a glikogén eluáló képességére. Ennek során az effektorok és glikogén együttes alkalmazásakor nyert eluciós görbéket összehasonlítottuk a kontrollvizsgálatokban kapott, ugyanolyan koncentrációjú, de effektormentes glikogénoldat eluáló effektusával.

A mérés körülményei az eddig alkalmazott eljáráshoz hasonlóak voltak: 1 cm Ø x 2 cm méretű keményítőoszlop a bevezetőben leírt módon előkészítve és mosva.

Az oszlopra Norit-cellulózzal kezelt (AMP-mentes!), kétszer kristályosított, pH 6,8-as pufferben oldott nyúl izom-foszforiláz-b-t adszorbeáltattunk.

A keményítőoszlop mosását az enzim felvitele után 16 ml 0,1 NaF—0,001 M EDTA—0,015 M MeEtOH (pH 6,8) mosópufferrel végeztük. A mosófolyadékot egy frakcióban összegyűjtve, aktivitásméréssel ellenőriztük, hogy enzimet ne eluáljon.

Eluálószerül 0,01% glikogént tartalmazó puffer szolgált.

Az eluálást kézi ballonnal, 5 ml/10 perc átfolyási sebesség mellett végeztük, + 5° C-on.

Az aktivitásmérést 0,2 ml eluátumból végeztük.

#### *AMP hatása a foszforiláz-b eluálásra*

50 E foszforilázt adszorbeáltatva keményítőoszlopra, az eluciót AMP nélkül és AMP jelenlétében végeztük a híg glikogénoldattal (3. ábra).

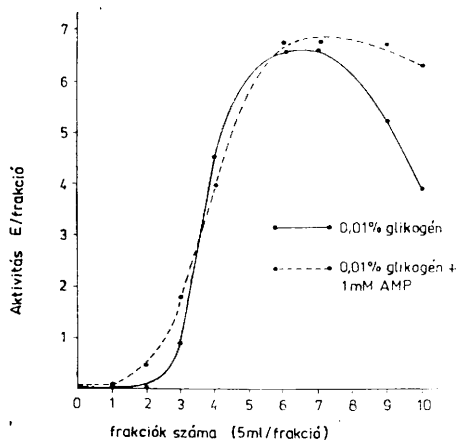
A 3. ábra eredményeiből látható, hogy az AMP, amely pedig a foszforiláz-b leghatásosabb allosztérikus aktivátora, a glikogénoldat eluáló képességére hatástalan.

#### *Glukóz-6-P hatása a foszforiláz-b eluálására*

Az AMP-hez hasonlóan megvizsgáltuk a glukóz-6-P hatását is a glikogénnel történő elucióra. A kísérlet eredményét a 4. ábra szemlélteti.

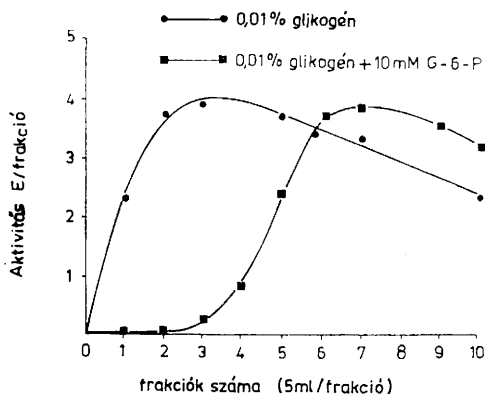
Látható, hogy a glukóz-6-P az alkalmazott 10 mM koncentrációban csökkenti a glikogén eluáló effektusát. A keményítő és a glikogén közötti kompetíció során tehát jobban csökkenti a foszforiláz glikogén iránti affi-

nitását, mint a keményítő irántit. Az ábrán a kísérleti eredmények feltüntetésekor korrekcióba vettük a glukóz-6-P-nek a foszforiláz-b-re kifejtett gátló hatását. Az eluciós közegbe került glukóz-6-P ugyanis gátolja a leoldott foszforiláz-b aktivitását. Az 1—4. frakcióban azonban ezt a gátló hatást korrekcióba véve sem található foszforiláz-aktivitás.



3. ábra

AMP hatása nyúl izomfoszforiláz-b glikogénnel történő eluciójára

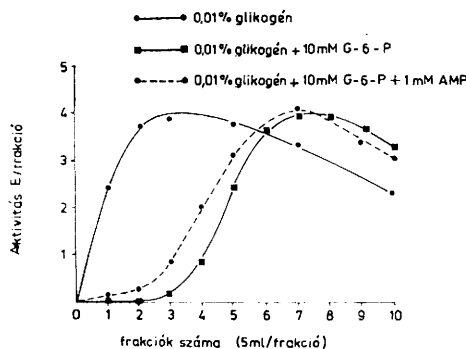


4. ábra

Glukóz-6-P hatása nyúl izomfoszforiláz-b glikogénnel történő eluciójára

Ismeretes, hogy a glukóz-6-P aktivitást gátló hatása AMP-vel felfüggeszthető. Így feimerül annak a lehetősége, hogy a glukóz-6-P eluálást csökkentő hatása is felfüggeszthető AMP-vel. Ennek kivizsgálása érdekében olyan eluálási kísérletet végeztünk, amelyben az alkalmazott eluens glukóz-6-P mellett AMP-t is tartalmazott.

Az 5. ábrából látható, hogy az AMP (az aktivitásmérésnél alkalmazott 1 mM koncentrációban) nem függeszti fel a glukóz-6-P eluciót gátló hatását.



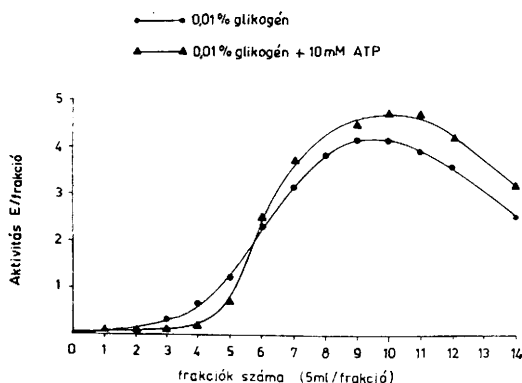
5. ábra  
AMP tartalmú glukóz-6-P hatása nyúl izomfoszforiláz-b glikogénnal történő eluciójára

Mindez azt igazolja, hogy a glukóz-6-P enzimaktivitást gátló hatása komplex jellegű,<sup>14</sup> az AMP-vel csak részben kompetitív. Feltehetően az enzim keményítőhöz, illetve glikogénhez való kötődését kevésbé befolyásolja, mint az enzim aktivitását.

#### ATP hatása a foszforiláz-b eluálására

Ismeretes, hogy az ATP a foszforiláz-b aktivitását jelentősen gátolja. Ezért feltehető volt, hogy hatást gyakorolhat a foszforiláz-b keményítőről való eluciójára is. Megvizsgáltuk tehát 10 mM ATP pelenlétében a glikogén foszforiláz-b-t eluáló hatását.

A 6. ábrán feltüntetett eredmények alapján megállapítható, hogy az ATP a glikogén eluáló effektusát nem befolyásolja.



6. ábra  
ATP hatása nyúl izomfoszforiláz-b glikogénnal történő eluciójára

Ezekből a vizsgálatokból megállapítható, hogy a keményítőn kötött foszforiláz glikogénnel történő elucióját a foszforiláz allosztérikus effektorai közül az AMP és ATP nem befolyásolja, a glukóz-6-P kismértékben gátolja.

### MEGBESZÉLÉS

A bevezetőben már láttuk, hogy a *De La Haba*-féle eljárás különböző szövetekben levő foszforilázok preparálására és tisztítására is alkalmas, ha kisebb-nagyobb módosításnak vetették alá. Ezzel kapcsolatban néhány kérdés kivizsgálása a módszer finomítását és tökéletesítését eredményezheti. Vizsgálataink — a teljesség igénye nélkül — ezek tanulmányozására irányultak.

*De La Haba* és munkatársai a keményítőn adszorbeált foszforilázt 0,4%-os glikogén oldattal eluálták. Az eluátumban levő foszforiláz csak a glikogén eltávolítása után kristályosítható. A glikogén eltávolítása enzimatis lebonntással lehetséges, ez azonban meglehetősen hosszadalmas, emiatt a foszforiláz tisztítása csak hosszabb idő alatt valósítható meg. Ezt lerövidítendő, tanulmányozni kívántuk, hogy a glikogén-koncentrációjának csökkentése milyen hatással van az elucióra. Azt tapasztaltuk, hogy a glikogén kisebb koncentrációban is hatásosan eluál; 0,01% az a határkoncentráció, amelyben a glikogént még alkalmazni lehet eluálásra. Ezért, továbbá azon feltevés miatt, amely szerint az allosztérikus effektorok befolyása a glikogén elucióra kisebb koncentrációjú glikogén alkalmazása esetén jobban kimutatható, további kísérleteinkhez ilyen koncentrációban alkalmaztuk a glikogént.

Megvizsgáltuk a különböző eredetű foszforilázok keményítőn való kötődését. Megállapítottuk, hogy a kötődés mértéke nagymértékben függ a foszforilázok eredetétől, minőségétől. Mivel a különböző eredetű foszforilázok pH-optimuma eltérő, tanulmányoztuk a pH hatását a keményítőn való adszorpciójukra. A különböző eredetű foszforilázok kötődésének pH-optimumai valóban eltérőeknek bizonyultak.

Nyúl izomfoszforiláz-b adszorpcióját és glikogénnel történő elucióját tanulmányoztuk a legismertebb allosztérikus effektorok (AMP, glukóz-6-P, ATP) jelenlétében is. Megállapítottuk, hogy a vizsgált effektorok közül az AMP és az ATP hatástalanok, a glukóz-6-P csökkenti a glikogén eluáló effektusát.

Miután a glukóz-6-P aktivitást gátló hatása AMP-vel felfüggeszthető, megvizsgáltuk, hogy a glukóz-6-P eluálást csökkentő hatása felfüggeszthető-e AMP-vel. Az AMP azonban nem függesztette fel a glukóz-6-P eluciót gátló hatását.

### Összefoglalás

A *De La Haba*-féle keményítő adszorpció eljárás módosításainak a hatását vizsgáltuk.

Megállapítottuk, hogy a glikogén az eddig alkalmazott 0,4%-osnál kisebb koncentrációban is hatásos eluáló effektussal rendelkezik, s így 0,01% glikogénoldat még jól alkalmazható.

Megállapítottuk, hogy a foszforiláz keményítőn való kötődésének mértéke nagymértékben függ a foszforilázok eredetétől és az alkalmazott pH-tól.

Megállapítottuk, hogy a gyakoribb allosztérikus effektorok közül az AMP és ATP nem befolyásolja, a glukóz-6-P viszont 10 mM koncentrációban csökkenti a glikogén eluáló hatását.

Vizsgálataink kísérletes részét a DOTE Orvosi Vegytani Intézetében végeztük, dr. Bot György professzor úr irányításával és segítségével, amelyért ezúton is őszinte köszönetünket fejezzük ki.

#### I R O D A L O M

- <sup>1</sup> Appleman, M., Krebs, E. G., Fischer, E. M.: *Biochemistry* 5, 2101—2107 (1966).
- <sup>2</sup> Cori, G. T., Green, A. A.: *Biol. Chem.* 151, 31 (1943).
- <sup>3</sup> G. De La Haba: *Biochym. Biophys. Acta* 59, 672 (1962).
- <sup>4</sup> Dummond, G. I., Keith, J., Gilgan, M. W.: *Asch. Biochem. Biophys.* 105, 156 (1964).
- <sup>5</sup> Fischer, E. H., Krebs, E. G.: *Methods in Enzimology* 5, 369 (1962).
- <sup>6</sup> Hanabusa, K., Kohno, K.: *J. Biochem.* 66, 69 (1969).
- <sup>7</sup> Helmreich, E., Cori C F.: *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S.* 51, 131 (1964).
- <sup>8</sup> Helmreich, E., Michalides, M. C., Cori, C. F.: *Biochem.* 6, 3695 (1967).
- <sup>9</sup> Leloir, L. F., Cardini, C. E.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 6340 (1957).
- <sup>10</sup> Lowry, O. H., Schultz, D. W., Passoneau, J. V.: *J. Biol. Chem.* 242, 271—280 (1967).
- <sup>11</sup> Maddaiah, V. T., Madsen, N. B.: *J. Biol. Chem.* 241, 3873—3881 (1966).
- <sup>12</sup> Sutherland, E. W.: *Methods in Enzimology* I. 215 (1955).
- <sup>13</sup> Taussky, H. H., Shorr, E.: *J. Biol. Chem.* 202, 675 (1952).
- <sup>14</sup> Wang, J. H., Tu, J. J., and Mei Lo, F.: *J. Biol. Chem.* 245, 3115—3121 (1970).
- <sup>15</sup> Will, H., Krause, E. G., Wollenberger, A.: (1970) *Biochem. Biophys. Res.-Comun* 40, 7.
- <sup>16</sup> Yamamoto, M.: *Can. J. Biochem.* 46/5. 423 (1948).
- <sup>17</sup> Yunis, A. A., Arimura, G. K.: *B. B. A.* 118, 335—343 (1966).
- <sup>18</sup> Yunis, A. A., Fischer, E. H., Krebs, E. G.: *J. Biol. Chem.* 235, 11 (1960).